世界知的所有権機関 国際事務局 特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 A23J 3/16, 3/34

A1

(11) 国際公開番号

WO00/62623

(43) 国際公開日

2000年10月26日(26.10.00)

(21) 国際出願番号

PCT/JP00/02403

JP

(22) 国際出願日

2000年4月13日(13.04.00)

(30) 優先権データ

特願平11/108818

1999年4月16日(16.04.99)

添付公開書類

(81) 指定国

国際調査報告書

請求の範囲の補正の期限前の公開;補正書受領の際には再公 開される。

CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)

AU, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH,

〒542-0086 大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号 Osaka, (JP)

(72) 発明者;および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)

津村和伸(TSUMURA, Kazunobu)[JP/JP]

齋藤 努(SAITOH, Tsutomu)[JP/JP]

釘宮 渉(KUGIMIYA, Wataru)[JP/JP]

〒300-2479 茨城県筑波郡谷和原村絹の台4丁目3番地

(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 不二製油株式会社 (FUJI OIL COMPANY, LIMITED)[JP/JP]

不二製油株式会社 つくば研究開発センター内 Ibaraki, (JP)

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING SOYBEAN PROTEIN

(54)発明の名称 大豆蛋白の製造方法

A process whereby soybean protein containing a reduced amount of phytic acid and having a high solubility and a good taste can be produced on an industrial scale. This process comprises treating undenatured soybean protein or soybean protein with a low extent of denaturation with a microbial-origin phytic acid decomposing enzyme having an activity within a pH range of from 6 to 9 to thereby decompose phytic acid in a pH range of from 6 to 9.

(57)要約

未変性或いは低変性大豆蛋白を、pHが6~9の範囲で活性を有する 微生物起源のフィチン酸分解酵素を使用して、pHが6~9の範囲でフィチン酸分解処理を施し、フィチン酸が低減され、しかも溶解性や風味 の良い大豆蛋白を工業的に生産可能な製造法を提供する。

- 1 -

明細書

大豆蛋白の製造方法

技術分野

本発明は、フィチン酸の低減された大豆蛋白の製造方法に関する。

背景技術

大豆は、良質の蛋白質を多く含み、古くから優れた蛋白質給源として利用されてきた。特に分離大豆蛋白は、蛋白質含有量が高く且つ乳化性、ゲル化性、保水性等の様々な機能特性を備えていることから食品素材あるいは食品改質素材として、食肉製品、水産練り製品、惣菜、パン、製菓、飲料用素材等に幅広く用いられている。しかも、その栄養価も高いことより、蛋白供給源としては理想的なものである。大豆中には、約1%のリンが含まれており、その70~80%はフィチン態として存在していると言われている。フィチン酸(ミオーイノシトールへキサリン酸エステル)は、栄養上重要なミネラル成分(カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛など)とキレート結合して難溶解性の化合物を形成するので、生体中でこれら微量金属の吸収が低下したり、消化酵素に対して影響を示し得ることから除去あるいは低減されることが好ましい。

そこで、大豆中のフィチン酸を低減化する多くの試みがなされている。フィチン酸を低減化する為に、大豆蛋白の等電点近傍 (pH5付近)にて水や塩溶液にて洗浄する方法 (特公平6-69345号公報、特開平9-121780号公報等)や電気透析にて除去する方法 (特開平7-227215号公報等)が提案されている。しかし、これらの方法では製造操作が繁雑で、しかも多量の廃液処理が必要であり商業的生産に

は不適当である。

一方、フィチン酸を分解する酵素(フィターゼ)で分解する方法も知られている。大豆蛋白の等電点近傍或いはそれ以下($pH2\sim6$)にて微生物由来フィターゼで処理する方法(特表平4-503002号公報)、アルコール変性大豆蛋白(NSI30以下)を等電点近傍(pH5.5)で処理する方法(特開平6-86640号公報)、加熱処理された豆乳に植物起源のフィターゼを作用させる方法(特公平1-27706号公報)、中性で活性を持つフィターゼを用い、加熱殺菌された市販豆乳を処理すること(特開平6-38745号公報)が知られている。しかしながら上記方法では、酵素はほとんど大豆蛋白の等電点近傍或いはそれ以下のpH域($pH2\sim6$)で作用させており、本発明者等の知見によれば、溶解性や風味が劣化する一因となっている。また、作用させる基質の蛋白質濃度を高くしがたく効率が悪かったり、作用に長時間を要して異味異臭を生じがちであった。

発明の目的

本発明の目的は、フィチン酸が低減され、しかも溶解性や風味の良い大豆蛋白を工業的に生産可能な製造方法を提供することにある。

発明の概要

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、pHが6以上にて未変性或いは低変性大豆蛋白をフィチン酸分解活性を有する酵素で処理することで、フィチン酸が大幅に低減され且つ溶解性や風味の良い大豆蛋白を得ることが可能であることを見いだし本発明を完成したものである。即ち、本発明は未変性或いは低変性大豆蛋白にpHが6~9の範囲でフィチン酸分解活性を有する酵素を反応させることを特徴とす

る大豆蛋白の製造方法を提供するものである。そしてここで使用される フィチン酸分解活性を有する酵素は、pHか6~9の範囲で活性を有す る酵素、とりわけ微生物由来の酵素が好ましい。

発明の詳細な説明

大豆蛋白は、豆乳、濃縮豆乳、脱脂大豆等、大豆蛋白を含むものであ れば可能であるが、未変性或いは低変性大豆蛋白を用いる。加熱等によ り過度に変性を受けた大豆蛋白をフィチン酸分解活性を有する酵素で処 理をする場合、溶液の粘度上昇やゲル化状態になり、特に分離大豆蛋白 や濃縮豆乳のように蛋白濃度が高い場合では、その処理や加工が困難に なる。例えば、フィチン酸が低減された分離大豆蛋白を製造するには脱 脂大豆をpH7~8で水抽出し、水不溶性画分(オカラ)と水溶性画分(豆乳) に分離し、該水溶性画分をpHが4.5付近で等電点沈殿させ、 不溶画分(カード)と可溶画分(ホエー)に分離して酸沈殿カードを得 て、該カードの水性懸濁液を中和し、殺菌・乾燥して製造する工程にお いて、脱脂大豆から豆乳を抽出する工程或いは、酸沈殿カードを中和す る工程に実施するのが効率よく実施できる。この時、使用する脱脂大豆 は蛋白変性を伴わない若しくは蛋白変性が軽度である加工処理を行った 所謂低変性脱脂大豆が好ましく、品種、産地等には限定されない。一般 的には、n-ヘキサンを抽出溶剤として低温抽出処理を行った脱脂大豆 が原料として適当であり、特にNSI(窒素可溶係数)が60以上、好 ましくは80以上の低変性脱脂大豆が好ましい。大豆蛋白を含む溶液中 の蛋白が加熱などにより変性を受けているか否かは、蛋白質のDSC(Differential Scanning Calorimetry) 分析することにより判別するこ とができる (Nagano et al., J. Agric. Food Chem., 40, 941-944(1992)) 。この分析方法によれば、例えば、未変性の分離大豆蛋白の場合、その 主要構成成分である7Sグロブリン、11Sグリブリンに由来するそれ ぞれの吸熱ピークが認められるのに対して、過度の変性を受けている分離大豆蛋白の場合ではそれらの吸熱ピークが認められないので、変性の 有無を容易に判別可能である。

本発明ではフィチン酸分解反応のp Hが特に重要で、 $pH6\sim9$ 、好ましくはpH6.0を越え、より好ましくは $pH6.2\sim8.5$ 、更に好ましくは $pH6.5\sim7.5$ で実施するのが良い。pH6未満で処理された大豆蛋白は、その溶解性が低下し、風味が悪くなり好ましくない。また、pHが9.0を越えても風味が悪くなり好ましくない。

従って、本発明で好適に用いられる酵素はpH6以上の中性乃至アルカリ域でフィチン酸及びフィチン酸塩を分解可能な酵素であることが必要である。フィチン酸及びフィチン酸塩を分解可能な酵素としては、動物、植物及び微生物起源の酵素が挙げられるが、蛋白質当たりの活性(比活性)が比較的高い微生物起源の酵素が好適に使用される。例えば、微生物由来であれば、アスペルギルス属(Aspergillus)、ペニシリウム属(Penicillium)、バチルス属(Bacillus)、シュードモナス属(Pseudomonas)、サッカロマイセス属(Saccharomyces)、クルイフェロマイセス属(Kluyveromyces)、ノイロスポラ属(Neurospora)から生産されるフィターゼが例示される。また、これら起源の酵素遺伝子を他の微生物にて発現させた酵素も使用できる。更にフィチン酸及びフィチン酸塩を分解可能なホスファターゼも含まれる。

酵素は粉末状や液体状の形態にかかわらず使用可能で、大豆蛋白中の 租蛋白質重量に対して0.01%~10重量%、好ましくは0.05% ~2重量%、より好ましくは、0.1~1重量%程度の添加にて実施されるが、酵素力価とし0.1~100U/g粗大豆蛋白質、好ましくは 0. 5~20U/g粗大豆蛋白質、より好ましくは1~10U/g粗大豆蛋白質程度のフィターゼが添加されるのが好ましい。尚、酵素活性は、4mMフィチン酸ナトリウムを含む0. 2MTris-HC1緩衝液(pH6. 5)0. 5m1、蒸留水0. 4m1及び酵素液0. 1m1からなる反応液を37℃で30分間反応させ、10%TCA1. 0m1を加え反応を停止する。この反応液中の無機リン酸含量をFiske-Subbarow方法により定量した。上記条件にて1分間に1マイクロモルの無機リン酸を遊離させる酵素量を1ユニット(U)とした。

酵素反応の温度と時間は、使用する酵素により決定できるが、通常 2 0 ℃~8 0 ℃、好ましくは 3 0 ℃~7 0 ℃、より好ましくは、4 0 ℃~6 0 ℃で、1 0 分~3 時間、好ましくは 3 0 分~1 時間反応する。また、酵素を固定化したカラムに通液することで、連続的に処理することも可能である。こうして得られる画分を公知の方法で中和、殺菌、乾燥して製造される。また、必要があれば得られた大豆蛋白に油脂及び/又は乳化剤を殺菌工程の前または殺菌工程の後、あるいは乾燥工程の後に添加することや、製造工程中に蛋白質分解酵素で処理することも任意である。さらにまた、UF及び等電点での沈砂分離を施して、分解物を除去しても良い。尚、フィチン酸含量は、公知の方法例えば、Cereal Chem. 63、475(1980) により測定できる。

通常の分離大豆蛋白が約2%のフィチン酸を含有するのに比べ、本発明で得られた大豆蛋白は、フィチン酸含量が0.2%程度以下は勿論、0.1%程度以下と大幅に低減され且つ本来の機能特性(溶解性等)や風味も損なわれていないので様々な食品素材等に使用可能であり、栄養面でも好ましい大豆蛋白が得られる。

以下、実施例により本発明の実施様態を具体的に説明する。ただし、 本発明はこれらの実施例にその技術範囲が限定されるものではない。

実施例1

低変性脱脂大豆(窒素可溶指数; NSI92)1重量部に12重量部の水を加え、室温、pHが7において1時間抽出後、遠心分離し、脱脂豆乳を得、塩酸にてpHが4.5に調整し、遠心分離した沈殿画分(以下酸沈殿カードと謂う)を得た。酸沈殿カードに水を加え、充分分散させ(租蛋白質量10重量%)、苛性ソーダでpHを6.5に調整後、フィターゼ(商品名「スミチームPHY」、新日本化学社製)を租蛋白質重量に対して0.4重量%(4U/g粗大豆蛋白質)を加え、40℃で1時間攪拌し、酵素反応を実施した。反応後、苛性ソーダでpHを7.0に再調整後、140℃、15秒殺菌し、これを噴霧乾燥し、大豆蛋白を得た。

実施例2

実施例1の酸沈殿カードに水を加え、充分分散させ(粗蛋白質量10重量%)、苛性ソーダでpH=7.0に調整後、フィターゼ(商品名「スミチームPHY」、新日本化学社製)を粗蛋白質重量に対して0.4重量%(4U/g粗大豆蛋白質)を加え、40℃で1時間攪拌し、酵素反応を実施した。反応後、140℃,15秒殺菌し、これを噴霧乾燥し、大豆蛋白を得た。

それぞれ得られた大豆蛋白のフィチン酸含量と溶解性、風味を、表1にまとめた。

比較例1、2

実施例1で得た酸沈殿カードに水を加え、充分分散させ(粗蛋白質量10重量%)、苛性ソーダでpHを5.5 (比較例1)及びpHを5.0 (比較例2)に調整後、フィターゼ(商品名「スミチームPHY」、新日本化学社製)を粗蛋白質重量に対して0.4重量%(4U/g粗大豆蛋白質)を加え、40°Cで1時間攪拌し、それぞれ酵素反応を実施し

た。反応後、苛性ソーダでpHを7.0に再調整後、140℃, 15秒 殺菌し、これらを噴霧乾燥し、大豆蛋白を得た

それぞれ得られた大豆蛋白のフィチン酸含量と溶解性、風味を、表1 にまとめた。

(表1)

処理の p H	フィチン酸含量	溶解性(NSI)	風味		
6.5 (実施例1)	0.05%	8 5	良好		
7.0 (実施例2)	0.06%	8 7	良好		
5.5 (比較例1)	0. 04%	6 5	やや悪い		
5.0 (比較例2)	0.04%	5 5	渋味がある		

以上のようにpHが6以上で処理することで、溶解性も風味も優れ、フィチン酸も低減された大豆蛋白が得られることが判る。

実施例3

実施例1の脱脂豆乳(pH7.0)に、フィターゼ(商品名「スミチームPHY」、新日本化学社製)を粗蛋白質重量に対して0.4重量%(4U/g粗大豆蛋白質)を加え、40℃で1時間攪拌し、酵素反応を実施した。反応後、直ちに塩酸にてpHを4.5に調整、遠心分離して酸沈殿カードを得て、これを水に分散させ、苛性ソーダでpHを7.0に調整し、140℃,15秒殺菌、噴霧乾燥して大豆蛋白を得た。得られた大豆蛋白はフィチン酸含量0.04%、溶解性(NSI)89で風味も良好であった。

実施例4

市販納豆より分離したBacillus subtilis を 0. 1 重量% Ca C 12

、1重量%D-マンノース、1重量%グルコース、1.5重量%酵母エ キス、2.5重量%ハート・インヒュージョンプロス (Difco製) からなる液体培地 (pH7.4) に接種し、37℃、5日間振とう培養 し、培養上清液を得た。培養上清液を限外ろ過膜(分画分子量1万)で 濃縮、DEAE-トヨパールカラムクロマトにてフィターゼの部分精製 画分を得た(40U/m1)。

実施例1の酸沈殿カードに水を加え、充分分散させ(粗蛋白質量10 重量%)、苛性ソーダでpHを7.5に調整後、前記Bacillus属由来部 分精製フィターゼを粗蛋白質重量に対して10U/g粗大豆蛋白質を加 え、40℃で1時間攪拌し、酵素反応を実施した。反応後、140℃, 15秒殺菌し、これを噴霧乾燥し、大豆蛋白を得た。得られた大豆蛋白 はフィチン酸含量 0.03%、溶解性(NSI)90で風味も良好であ った。

実施例5

丸大豆を水に一夜浸漬し、浸漬大豆(水分約50%)1部に水2.5 部をグラインダーで生呉を調製した。この生呉を遠心分離機にかけ、豆 乳とおからに分離し、得られた豆乳(固形分9重量%、粗蛋白質4.5 重量%)を真空濃縮機で濃縮豆乳(固形分13重量%、粗蛋白質6.5 重量%) を調製した。この濃縮豆乳 (pH6.2) にフィターゼ (商品 名「スミチームPHY」、新日本化学社製)を粗蛋白質重量に対して0 4 重量%(4 U/g粗大豆蛋白質)を加え、40℃で1時間攪拌し、 酵素反応を実施した。反応後、直ちに苛性ソーダでpHを7.0に調整 し、140°C, 15秒殺菌した。得られた濃縮豆乳はフィチン酸含量0 . 07%、溶解性(NSI) 86で風味も良好であった。

比較例3

実施例5と同様に調製した生呉を95℃、5分間加熱し、速やかに2

0℃まで冷却し遠心分離機にかけ、豆乳とおからに分離した。得られた豆乳(固形分9重量%、粗蛋白質4.5重量%)を真空濃縮機で濃縮した。この濃縮豆乳(固形分13重量%、粗蛋白質6.5重量%、pH6.2)にフィターゼ(商品名「スミチームPHY」、新日本化学社製)を粗蛋白質重量に対して0.4重量%(4U/g粗大豆蛋白質)を加え、40℃で攪拌し、酵素反応を開始した。反応開始直後より粘度が上昇し、次第にゲル状になった。よって加熱された濃縮豆乳での実施は困難であった。

請求の範囲

- 1. 未変性或いは低変性大豆蛋白にpHが6~9の範囲でフィチン酸分解活性を有する酵素を反応させることを特徴とする大豆蛋白の製造方法。
- 2. フィチン酸分解活性を有する酵素が、pHが6~9の範囲で活性を有する酵素である請求項1記載の製造方法。
- 3. フィチン酸分解活性を有する酵素が、微生物由来の酵素である 請求項1または2記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A23J3/16, A23J3/34							
According to	According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC						
	SEARCHED						
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A23J3/16, A23J3/34, A23J1/14, C12N9/16							
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched							
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG)							
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT						
Category*	Citation of document, with indication, where ap	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.				
х	JP, 6-38745, A (National Federat Assoc.), 15 February, 1994 (15.02.94)	1-3					
Y	EP, 753999, A1 (NOVO-NORDISK AS 22 January, 1997 (22.01.97) & WO, 95/27406, A1 & AU, 9522! & JP, 9-512164, A	1-3					
Y	EP, 756457, A1 (NOVO-NORDISK AS), 05 February, 1997 (05.02.97) & WO, 95/28850, A1 & AU, 9523431, A & US, 5989600, A & JP, 9-511913, A		1-3				
		·					
	L cn						
	r documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.					
	categories of cited documents: ent defining the general state of the art which is not	"T" later document published after the inte priority date and not in conflict with th					
conside "E" earlier	red to be of particular relevance document but published on or after the international filing	"X" understand the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive					
	ument which may throw doubts on priority claim(s) or which is I to establish the publication date of another citation or other considered novel or cannot be considered novel or cannot b						
special	special reason (as specified) considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such						
means "P" docum							
	actual completion of the international search august, 2000 (07.08.00)	Date of mailing of the international sear 15 August, 2000 (15.					
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer					
Facsimile No.		Telephone No.					

	<u> </u>				
A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC)) Int. Cl ⁷ A23J3/16, A23J3/34					
B. 調査を行					
	小限資料(国際特許分類(IPC))				
Int.Cl'A	A23J3/16, A23J3/34, A23	1/14, C12N9/16			
最小限資料以外	の資料で調査を行った分野に含まれるもの				
		•			
	·				
国際調査で使用	した電子データベース(データベースの名称、	調査に使用した用語)			
BIOSIS	S (DIALOG)				
C. 関連する	と認められる文献				
引用文献の	10 177 - Light to 17 at lan - Advance 14 883 Lan 1	A LL Y A BRIEFLY MAN A SEC.	関連する		
カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連すると		請求の範囲の番号		
X	JP, 6-38745, A (全国農業		1 - 3		
	月. 1994 (15. 02. 94)				
Y	EP, 753999, A1 (NOVO-NO		1 - 3		
	997 (22. 01. 97) &WO,	95/27406, A1&A			
	U, 9522552, A&JP, 9-	-512164, A			
	EP, 756457, A1 (NOVO-NO		1-3		
	97 (05. 02. 97) & WO, 95/28850, A1&A				
	U, 9523431, A&US, 59				
	511913, A				
	•				
			<u> </u>		
□ C欄の続き	にも文献が列挙されている。	□ パテントファミリーに関する別	紙を参照。		
* 引用文献の		の日の後に公表された文献			
	のある文献ではなく、一般的技術水準を示す				
もの て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理 の					
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日 論の理解のために引用するもの 以後に公表されたもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明					
以後に公表されたもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 の新規性又は進歩性がないと考えられるもの					
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以					
文献 (理由を付す) 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに					
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 よって進歩性がないと考えられるもの					
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 「&」同一パテントファミリー文献					
国際調査を完了した日 国際調査報告の発送日 4 5 00 00					
国際調査を完了した日 07.08.00		国際調査報告の発送日 15.0	8. <i>0</i> 0.		
国際調査機関の名称及びあて先		特許庁審査官(権限のある職員)	4N 8114		
日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100~8915		鈴木 恵理子 (三月	رد!		
1		電話番号 03-3581-1101	クリック		
I 75.75.181	114				